

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 788 058

②1 N° d'enregistrement national : **98 16700**

⑤1 Int Cl⁷ : C 07 K 14/635, A 61 K 7/48, 38/29, A 61 P 17/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30.12.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 07.07.00 Bulletin 00/27.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SEDERMA SA Société anonyme —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : LINTNER KARL.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) :

⑤4 COMPOSITIONS COSMETIQUES AMINCISSANTES.

⑤7 Le brevet décrit les séquences peptidiques dérivées
de l'hormone parathyroïdienne (ou encore pTH), possédant
une activité lipolytique qui est avantageusement mise à pro-
fit dans des produits cosmétiques ou dermo-pharmaceuti-
ques amincissants, utilisés par voie topique.

Cette activité est renforcée quand les peptides sont mo-
difiés chimiquement pour augmenter leur lipophilie.

Ces peptides peuvent être obtenus par synthèse, par
biotechnologie ou par hydrolyse ménagée de protéines vé-
gétales.

FR 2 788 058 - A1



L'industrie cosmétique est en permanence à la recherche de nouveaux ingrédients actifs possédant des activités lipolytiques, pour les intégrer dans des produits dits amincissants. De nombreuses substances (molécules pures comme les dérivés de xanthine; mélanges complexes comme certains extraits de plantes, ...) sont proposées et utilisées.

Le marché demande néanmoins des nouveautés et des produits toujours plus actifs. Les substances adrénérquiques (adrénaline et analogues) sont bien connues pour leur impressionnante capacité à stimuler la lipolyse dans les adipocytes mais, leur emploi est formellement interdit en cosmétique et en dermopharmaceutique.

Récemment, d'autres classes de substances, de nature différente, ont été identifiées comme étant également capables de stimuler, à des degrés divers, la lipolyse des triglycérides dans les adipocytes humains et/ou animaux.

Il s'agit de peptides de courte chaîne à caractère hormonal comme, par exemple, l'hormone para-thyroïdienne (pTH (1-84)) ou son fragment pTH (1-34).

Ces peptides sont susceptibles de stimuler la lipolyse, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, par le biais de l'activation de l'adénylate cyclase membranaire (par exemple: Tanigushi A. et al. *J. Lip. Res.* (1987) **28** :490-496).

Malheureusement, le plus petit des deux peptides mentionnés ci-dessus, le pTH (1-34), comporte une séquence de 34 acides aminés (H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH), ce qui rend sa synthèse à l'échelle industrielle très difficile, et par conséquent son utilisation incompatible avec les exigences économiques du marché cosmétique visé.

Récemment, un brevet a décrit l'utilisation de fragments de ce pTH (1-34), N-acylés ou non, composés de 3 à 10 acides aminés, dont la séquence débutait par Ser-Val, pour leurs effets amincissants par voie topique (FR 98 09193).

Au vu de l'ensemble de la littérature scientifique (par exemple: Taniguchi A. et al. (1987) *J. of Lipid Res.* **28** :490-494), la présence des deux acides aminés N-terminaux (Ser-Val) semblait alors être obligatoire.

L'objet du présent brevet est la double découverte que l'activité lipolytique, tant *in vivo* qu'*in vitro*, était portée par des fragments peptidiques, dérivé de la pTH:

- même si le coté N-peptidique ne contient pas la séquence classique Ser-Val,
- même si le peptide n'est constitué que de 3 à 11 acides aminés.

Ces peptides correspondent donc à des fragments qui déclinent toutes les possibilités de longueur et de clivage de la pTH (9-19).

5 Les peptides hybrides, obtenus par greffage du dipeptide Ser-Val du coté N-terminal dans les séquences décrites ci-dessus, n'ont pas démontré d'activité lipolytique supérieure à celle des séquences initiales.

De manière surprenante, l'activité *in vitro* se retrouve *in vivo* après application par voie topique, et donc dans une approche relevant de la cosmétique.

10 De par leurs longueurs plus courtes, la synthèse industrielle de ces peptides devient économiquement réaliste, et de par la forte activité lipolytique des séquences décrite ici, il est tout à fait possible d'utiliser ces peptides dans toutes compositions cosmétiques et dermatopharmaceutiques.

Le peptide, séquence minimale, est constitué de Gly-Lys-His quand l'undécapeptide, 15 séquence la plus longue, correspond à His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu.

Enfin, tout comme dans le brevet FR 98 09193, afin de rendre tous ces peptides encore plus actif par voie topique, il est avantageux de les rendre lipophiles par un greffage d'un acide gras de plus ou moins longue chaîne (mirystyl, palmityl, stéaryl, 20 lipoyl...) sur l'amine N-terminale et/ou d'estérifier le groupe carboxyle du peptide.

Sont donc concernés par ce brevet, les divers fragments du peptide pTH (9-19), caractérisés en ce qu'ils contiennent la séquence de structure générale suivante:



25 où $R_1 = H$, ou une chaîne alkyle, linéaire ou branchée, saturée ou insaturée, hydroxylée ou soufrée ou non, contenant 1 à 24 atomes de carbone, préférentiellement 12 à 18 atomes de carbone,

et $R_2 = OH$ ou OR_3 ou NR_4R_5 avec $R_3 =$ une chaîne alkyle de C_1 à C_{24} , préférentiellement soit C_1 à C_3 , soit C_{14} à C_{18} et avec R_4R_5 étant indépendamment l'un de l'autre = H ou une chaîne alkyle de 1 à 12 atomes de carbone, 30 préférentiellement de 1 à 3 atomes de carbone,

et AA est tout ou partie de la séquence peptidique suivante His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu (pTH (9-19)), préférentiellement Gly-Lys-His-Leu-Asn (pTH (12-16)) ou même Gly-Lys-His (pTH (12-14)).

Les peptides qui répondent aux séquences décrites ci dessus possèdent une réelle et importante activité lipolytique par voie topique qui est utilisable en cosmétique et dermatopharmacie.

Les peptides, objets du brevet, peuvent être obtenus soit par synthèse chimique classique (en phase solide ou en phase homogène liquide), soit par synthèse enzymatique (Kullman et al., J. Biol. Chem. 1980, 255, 8234) à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.

Les peptides peuvent être obtenus également par fermentation d'une souche de bactéries modifiées ou non par génie génétique, pour produire les séquences recherchées ou leurs différents fragments.

Enfin, les peptides peuvent être obtenus par extraction de protéines d'origine animale ou végétale, préférentiellement végétale, suivie d'une hydrolyse contrôlée qui libère les fragments peptidiques en question, avec la stipulation que les fragments libérés correspondent aux séquences peptidiques pTH(9-n) avec n compris entre 10 et 19 inclus. De nombreuses protéines trouvées dans les plantes sont susceptibles de contenir ces séquences au sein de leur structure. L'hydrolyse ménagée permet de dégager ces fragments peptidiques.

Pour réaliser l'invention, il est possible, mais non nécessaire, d'extraire soit les protéines concernées d'abord et de les hydrolyser ensuite, soit d'effectuer l'hydrolyse d'abord sur un extrait brut et de purifier les fragments peptidiques ensuite. On peut également utiliser l'hydrolysât sans en extraire les fragments peptidiques en question, en s'assurant toutefois d'avoir arrêté la réaction enzymatique d'hydrolyse à temps et de doser la présence des peptides en question par des moyens analytiques appropriés (traçage par radioactivité, immunofluorescence ou immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques, etc.).

D'autres procédés plus simples ou plus complexes conduisant à des produits moins chers ou plus purs sont facilement envisageables par l'homme de l'art connaissant le métier de l'extraction et de la purification des protéines et peptides.

A titre d'exemple illustrant l'invention, on cite quelques formules cosmétiques représentatives mais non limitatives de l'invention:

Exemple n° 1: Gel amincissant

	Carbopol 1342R	0,3
5	Propylène glycol	2,0
	Glycérine	1,0
	Vaseline blanche	1,5
	Cylomethicone	6,0
	Alcool cétylique	0,5
10	Lubrajel [®] MS	10
	triéthanolamine	0,3
	Gly-Lys-His	0,01
	Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g.

Exemple n°2: Crème amincissante

15	Stéareth-21	2.4
	Stéareth-2	2.6
	PPG-15 stéaryl éther	8.0
	Cire d'abeille	0.5
	Stéaroxy diméthicone	3.0
20	Propylène glycol	3.0
	Carbopol [®] 941	0.25
	Triéthanolamine	0.25
	N-Palmitoyl-Gly-Lys-His-Leu-Asn	0.01
	Caféine	1.0
25	Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

Exemple n° 3: Lotion alcoolique

	Ethanol	5.0
	Propylène glycol	2.0
	Diméthicone copolyol	0.5
30	PPG-1-PEG-9 lauryl glycol éther	0.6
	N-Palmitoyl-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His	0.001

eau, conservateurs, parfum qsp 100 g

L'activité des peptides sera démontrée par les deux exemples suivants:

Exemple n° 4: Activité lipolytique *in vitro*

Dans cet exemple, 5 séquences peptidiques ont été testées:

5 Peptide 1: His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu, soit la séquence la plus longue décrite dans ce brevet,

Peptide 2: His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn,

Peptide 3: Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu,

Peptide 4: Gly-Lys-His-Leu-Asn,

10 Peptide 5: Gly-Lys-His, soit la séquence la plus courte de ce brevet.

Des adipocytes humains (obtenus à partir de déchets de chirurgie plastique) sont mis en suspension dans un milieu de survie.

On ajoute alors, à différentes concentrations, l'un des 4 peptides précédents et, après 2 heures d'incubation à 37°C, on mesure la quantité de glycérol et d'acides gras libérés dans le milieu extérieur.

15 Dans les mêmes conditions, le métabolisme lipolytique de base et une série de contrôles positifs sont réalisés, respectivement en l'absence du peptide testé ou en présence de différentes concentrations de pTH (1-34) qui est alors considéré comme produit de référence.

20 Le tableau suivant montre les quantités de glycérol libéré ($\text{nmol}/2,5 \cdot 10^5 \text{ cellules}/2\text{hr}$) ainsi que le pourcentage d'augmentation (par rapport au niveau basal) observé avec les peptides testés dans ces conditions sous une concentration finale de $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

	Basal	pTH (1-34)	Peptide 1	Peptide 2	Peptide 3	Peptide 4	Peptide 5
Glycérol	17,5 ± 1,1	30,5 ± 1,1	27,7 ± 0,8	24,3 ± 0,8	25,6 ± 0,9	23,7 ± 0,5	20,3 ± 0,6
Δ %	-	+ 75,1	+ 58,2	+ 39,2	+ 46,2	+ 35,4	+ 16,8

25 Dans les mêmes conditions expérimentales, on peut également suivre la variation de la concentration d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) dans le milieu cellulaire.

30 Lorsque des concentrations inférieures de peptides ont été testées, un effet concentration dépendant a été mis en évidence sur la libération de glycérol, ce qui démontre bien la spécificité du mécanisme biochimique et physiologique mis en jeu.

Exemple n° 5: Activité lipolytique *in vivo*

Un test *in vivo*, effectué sur 15 femmes âgées de 35 à 62 ans pendant quatre semaines, a consisté à suivre l'évolution de deux paramètres, le périmètre des cuisses mesuré à l'aide d'un centimètre et l'épaisseur de la couche adipeuse déterminée à l'aide de la technique d'échographie (ultrasons). Les résultats donnés plus loin concernent donc les différences observées entre les valeurs obtenues pour ces deux paramètres entre le temps 0 et en fin de test, soit 4 semaines plus tard.

Le gel décrit dans l'exemple n°1 a été utilisé, si ce n'est que le peptide était absent du gel placebo.

Après 4 semaines de traitement biquotidien avec des gels (un gel placebo et un gel contenant le peptide Gly-Lys-His-Leu-Asn, on constate une évolution favorable du périmètre et de l'épaisseur de la couche adipeuse sur les cuisses traitées à la préparation contenant le peptide lipolytique: -12% et -14% respectivement, alors que les variations des valeurs de ces deux paramètres sur les cuisses traitées au placebo ne sont pas significatives.

Les peptides à caractère lipolytique sont utilisés seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.

Il est possible d'utiliser ces peptides sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulés dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, les liposomes ou les chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

La concentration d'utilisation de ces peptides peut varier entre 0.000001 et 1% (p/p), préférentiellement entre 0.0001 et 0.1% dans le produit fini.

Ces peptides peuvent être combinés dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes

actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, extraits marins, etc.

Ces peptides sont obtenus par extraction de protéines de plantes, suivie d'hydrolyse enzymatique de façon à générer des fragments peptidiques de taille moyenne inférieure à 1500 daltons, une partie des fragments libérés devant contenir au moins une des séquences correspondant au pTH (9-n) avec n compris entre 10 et 19 inclus.

La combinaison avec d'autres agents stimulant la lipolyse tels que la caféine, la théophylline, les dérivés de xanthine en général est particulièrement avantageuse pour réaliser l'invention.

Ces peptides sont utilisés dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques pour des applications cosmétiques à activité lipolytique pour les soins de la peau, particulièrement le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermissement cutané.

Ces peptides ou les compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques les contenant sont utilisées pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, particulièrement pour le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermissement cutané.

Revendications

1. Peptides fragments du pTH(1-34) de structure suivante:



avec

- $R_1 = H$, ou une chaîne alkyle, linéaire ou branchée, saturée ou insaturée, hydroxylée ou soufrée ou non, contenant 1 à 24 atomes de carbone, préférentiellement 12 à 18 atomes de carbone,
- $R_2 = OH$ ou OR_3 ou NR_4R_5 avec $R_3 =$ une chaîne alkyle de C_1 à C_{24} , préférentiellement soit C_1 à C_3 , soit C_{14} à C_{18} et avec R_4R_5 étant indépendamment l'un de l'autre $= H$ ou une chaîne alkyle de 1 à 12 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 3 atomes de carbone,
- AA est, tout ou partie de longueur variable de la séquence peptidique suivante His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu (pTH(9-19)), dont préférentiellement Gly-Lys-His-Leu-Asn (pTH(12-16)) ou Gly-Lys-His (pTH(12-14)).

2. Peptides selon la revendication 1 obtenus par synthèse chimique, par voie enzymatique, par fermentation ou par extraction de protéines d'origine végétale.

3. Peptides selon 1 à 2 obtenus par synthèse peptidique classique en phase homogène ou hétérogène ou par synthèse enzymatique à partir des acides aminés constitutifs.

4. Peptides selon les revendications 1 à 3 obtenus par extraction de protéines de plantes, suivie d'hydrolyse enzymatique de façon à générer des fragments peptidiques de taille moyenne inférieure à 1500 daltons, une partie des fragments libérés devant contenir au moins une des séquence correspondant au pTH (9-n) avec n compris entre 10 et 19 inclus.

5. Peptides selon les revendications 1 à 4 caractérisés en ce que leur lipophilie est augmentée par greffage d'un acide gras de plus ou moins longue chaîne (mirystyl, palmityl, stéaryl, lipoyl...) sur l'amine N-terminale et/ou d'estérifier le groupe carboxyle du peptide.

6. Utilisation des peptides, selon les revendications 1 à 5, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, à des concentrations variant entre 0.000001 et 1% (p/p), préférentiellement entre 0.0001 et 0.1%.

7. Utilisation des peptides, selon les revendications 1 à 5 et la revendication 6, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulées dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro-ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
8. Utilisation des peptides, selon les revendications 1 à 5 et 6 à 7, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.
9. Utilisation des peptides selon les revendications 1 à 5 et 6 à 8, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits de plantes, extraits tissulaires, extraits marins, caféine, théophylline, dérivés de la xanthine et autres agents lipolytiques.
10. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques renfermant les peptides selon les revendications 1 à 5 et 6 à 9 utilisées dans les applications cosmétiques à activité lipolytique pour les soins de la peau, particulièrement le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermisssement cutané.
11. Utilisation des peptides selon les revendications 1 à 5, ou d'une composition cosmétique ou dermatopharmaceutique renfermant les peptides selon les revendications 6 à 9, pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, particulièrement pour le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermisssement cutané.

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 570495
FR 9816700

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DE 44 34 551 A (FORSSMANN WOLF GEORG PROF DR D) 4 avril 1996 (1996-04-04) * le document en entier *	1-4
A,D	TANIGUCHI A ET AL: "Parathyroid hormone-induced lipolysis in human adipose tissue." JOURNAL OF LIPID RESEARCH, (1987 MAY) 28 (5) 490-4. JOURNAL CODE: IX3. ISSN: 0022-2275., XP002099124 United States * le document en entier *	1-11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 septembre 1999		Groenendijk, M
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)